

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

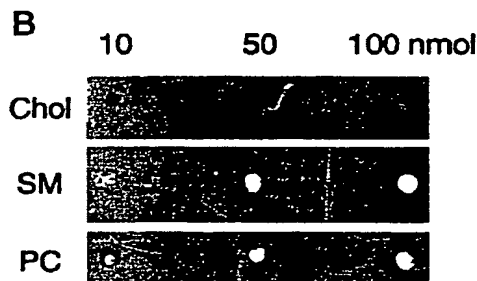
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/102596 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/92
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/06841
- (22) 国際出願日: 2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-160277 2002 年 5 月 31 日 (31.05.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 俊秀 (KOBAYASHI, Toshihide) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama
- (JP). 佐藤 智 (SATO, Satoshi) [JP/JP]; 〒604-8271 京都府 京都市中京区 釜座道御池下る津軽町 7 7 4-1 Kyoto (JP). 濱島 好男 (HAMASHIMA, Yoshio) [JP/JP]; 〒615-8084 京都府 京都市西京区 桂坤町 2 6-2 0 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHOLESTEROL DETECTION REAGENT

(54) 発明の名称: コレステロール検出試薬



(57) Abstract: It is intended to provide a novel reagent for detecting cholesterol containing a substance which specifically binds to cholesterol and thus enables the detection of cholesterol; and a method of detecting cholesterol using the same. Namely, a reagent for detecting cholesterol which contains optionally labeled polyethylene glycol cholesteryl ether.

(57) 要約: 本発明の目的は、コレステロールと特異的に結合することによりコレステロールを検出することができる物質を含む新規なコレステロール検出試薬およびそれをを用いたコレステロールの検出方法を提供することである。本発明によ

れば、標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含む、コレステロール検出試薬が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/102596 A1

明細書

コレステロール検出試薬

技術分野

本発明は、コレステロール検出試薬、及びそれを用いたコレステロールの検出方法に関する。より詳細には、本発明は、ポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含むコレステロール検出試薬、及びそれを用いたコレステロールの検出方法に関する。

背景技術

細胞内コレステロールの含量および分布は厳密に調節されている。細胞内において、コレステロールはゴルジ後膜に蓄積する (M. S. Bretscher, 他、Science 261, 1280-1. (1993))。原形質膜上で、コレステロールはスフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質と一緒にあってミクロドメインを形成する (A. Rietveld, 他、Biochim Biophys Acta 1376, 467-79. (1998) ; 及び、R. E. Brown, J Cell Sci 111, 1-9. (1998))。カベオリン、及びグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 結合糖タンパク質および二重にアシル化された非受容体型チロシンキナーゼ等の他のクラスのタンパク質がこのドメインに存在する (T. V. Kurzchalia, 他、Curr Opin Cell Biol 11, 424-31. (1999) ; 及び E. Ikonen, 他、Traffic 1, 212-7. (2000))。このドメインは脂質ラフトとして知られている。脂質ラフトは、シグナリング、接着、運動および膜通過などの細胞機能において重要な役割を果たす (D. A. Brown, 他、Annu Rev Cell Dev Biol 14, 111-36 (1998) ; 及び、K. Simons, 他、Nat Rev Mol Cell Biol 1, 31-9. (2000))。メチル- β -シクロデキストリン (M β CD) により表面のコレステロールを除去するか、または代謝阻害剤を用いることにより細胞のコレステロール含量が減少すると、このドメインの分解が引き起こされる (L. J. Pike, 他、J Biol Chem 273, 22298-304. (1998) ; A. Pralle, 他、J Cell Biol 148, 997-1008. (2000) ; 及び、K. Roper, 他、Nat Cell Biol 2, 582-92. (2000))。

細胞のコレステロール含量は、de novo 合成と、リポタンパク質のエンドサイトーシスにより外部から得られるコレステロールとの均衡を通して調節される (M. S. Brown, 他、Proc Natl Acad Sci USA 96, 11041-8. (1999) ; K. Simons, 他、Science 290, 1721-6. (2000) ; 及び、Y. A. Ioannou, Nat Rev Mol Cell Biol 2, 657-68. (2001))。この調節が破綻すると、動脈硬化またはニーマン-ピック病 C 型 (NPC) のような病態が引き起こされる (P. G. Pentchev 他、Biochim Biophys Acta 1225, 235-43. (1994) ; 及び、L. Liscum, Traffic 1, 218-25. (2000))。後期エンドソームのリゾビスホスファチジン酸リッチな内膜ドメインは収集および分配装置として作用することにより、コレステロール輸送の調節に関与する (T. Kobayashi 他、Nat Cell Biol 1, 113-8. (1999))。しかし、コレステロールおよび／またはコレステロールリッチな膜ドメインの細胞内輸送については、ほとんど知られていない。

ポリエチレングリコールコレステリルエーテル (PEG-Chols) は、疎水性のコレステリル部分および親水性のポリエチレングリコール部分からなる非イオン性かつ両親媒性の一群の分子である (図 1 A) (H. Ishiwata, 他、Biochim Biophys Acta 1359, 123-35 (1997))。PEG (50)-Chol (分子量は 2587、括弧内の数字である 50 はエチレングリコールの反復数を示す) は、培地中の生細胞に添加すると、クラスリンを介したトランスフェリンのインターナリゼーションに影響を与えない条件下において、クラスリンとは無関係であるカベオラ様エンドサイトーシスを阻害することが知られている (T. Baba 他、Traffic 2, 501-12. (2001))。しかしながら、PEG-Chol が細胞の如何なる成分と相互作用するのかは不明であった。

発明の開示

本発明は、ポリエチレングリコールコレステリルエーテルが細胞内で特異的に結合することができる分子を同定することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、コレステロールと特異的に結合することによりコレステロールを検出することができる物質を含む新規なコレステロール検出試薬およびそれを用いたコ

レステロールの検出方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、PEG(50)-Cholによりクラスリンとは無関係のエンドサイトーシスが特異的に阻害されるという以前の知見を考慮して、PEG-Cholが一以上の脂質ラフト成分と特異的に相互作用している可能性があるものと推測し、オーバーレイ・アッセイを使用して、PEG-Cholが様々な脂質と *in vitro* で結合することを確認した。さらに細胞内でPEG-Cholが相互作用する物質を検討した結果、PEG-Cholがコレステロールに特異的に結合することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含む、コレステロール検出試薬が提供される。

本発明の別の側面によれば、標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを用いることを特徴とする、コレステロールの検出方法が提供される。

本発明では、親和性物質又は蛍光物質で標識されているポリエチレングリコールコレステリルエーテルを用いることが好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、PEG-Cholを用いた *in vitro* での結合実験の結果を示す。

図2は、細胞を用いたPEG-Cholによる標識実験の結果を示す。バーは20 μ mを示す。

図3は、fPEG-Cholの細胞表面の分布を調べた結果を示す。

図4は、fPEG-Cholの細胞表面の分布を調べた結果を示す。

図5は、fPEG-Cholの細胞表面の分布を調べた結果を示す。

図6は、コレステロールの膜内分布及び細胞表面での挙動を分析した結果を示す。

図7は、コレステロールの膜内分布及び細胞表面での挙動を分析した結果を示す。

す。

図8は、コレステロールの膜内分布及び細胞表面での挙動を分析した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明のコレステロール検出試薬は、標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含むものである。

本発明で用いるポリエチレングリコールコレステリルエーテルとは、図1Aに記載した構造を有する化合物であり、疎水性のコレステリル部分および親水性のポリエチレングリコール部分からなる化合物である(H. Ishiwata, 他、Biochim Biophys Acta 1359, 123-35(1997))。nはポリエチレングリコール部分におけるエチレングリコールの反復数を示す。本発明で用いるポリエチレングリコールコレステリルエーテルにおけるnの数は、コレステロールとの結合性に悪影響を与えない限り特に限定されないが、例えば、10～1000、好ましくは20～200、より好ましくは20～100程度である。好ましく使用できる一例としては、n=50のポリエチレングリコール部分を含むポリエチレングリコールコレステリルエーテルを挙げることができる。

本発明で用いるポリエチレングリコールコレステリルエーテルは公知の化合物であり、例えば、上記の文献(H. Ishiwata, 他、Biochim Biophys Acta 1359, 123-35(1997))に記載されている。本発明で用いるポリエチレングリコールコレステリルエーテルは、コレステロールを溶媒に溶かしエチレングリコールガスを注入し反応させることにより製造することができる(Ishiwata 他、Chem Pharm Bull 43, 1005-1011(1995))。この他、ポリエチレングリコールコレステリルエーテルは、コレステロールのトルエンスルホン酸エステルとポリエチレングリコールとを反応させる方法により製造することもできる(Patel 他、Biochim Biophys Acta 797:20-26(1984))。

本発明で用いるポリエチレングリコールコレステリルエーテルとしては、検出のための標識物質が結合しているものを使用することが好ましい。このような標識物質の種類は特に限定されないが、例えば、親和性物質、蛍光物質、放射性物質などが挙げられる。

親和性物質としては、ビオチンまたはジゴキシゲニンなどを使用することができる。蛍光物質としては、フルオレセイン (fluorescein) 、F I T C、BODIPY 493/503、BODIPY FL、ジアルキルアミノクマリン、2' , 7' -ジクロロフルオレセイン、ヒドロキシクマリン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、Oregon Green 514、テトラメチルローダミン (TMR) 、X-ローダミン、NBD、T R I T C、T e x a s、C y 5、C y 7、I R144、FAM、J O E、TAMRA、R O Xなどを使用することができる。放射性物質としては、 ^{32}P 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{45}Ca 、 ^3H 、 ^{14}C などを使用することができる。この他、酸化ストレス検出剤 (同仁) carboxy-PTIO、DTCS ; NO発生剤 (同仁) BNN5 ; 種々の caged アミノ酸 ; キレート剤 (例えば、DTPA、EDTA、NTA など) 、種々の carboxy disulfide ((カルボン酸) S-S (カルボン酸) の構造を有する) 等を使用することができる。

本発明のコレステロール検出試薬は、上記した標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含む限り、その形態は特に限定されず固体でも液体 (溶液、懸濁液など) でもよい。液体の場合には適当な溶媒 (好ましくは、該ポリエチレングリコールコレステリルエーテルが一定の溶解度を示す有機溶媒など) に溶解または懸濁することによって試薬を調製することができる。上記した形態で提供される本発明の試薬には、ポリエチレングリコールコレステリルエーテル以外の助剤 (例えば、保存剤、安定化剤、p H緩衝剤など) を適宜添加することもできる。

本発明によれば、標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを用いてコレステロールを検出する方法も提供される。検出はインビトロで行ってもよいし、細胞内で行ってもよいし、あるいは生体内で行ってもよい。まず、検出すべきコレステロールを含む試料と、 (好ましくは標識されている)

ポリエチレングリコールコレステリルエーテルとを一定条件下で接触させることにより、両者を結合させる。

結合後に、コレステロールに結合したポリエチレングリコールコレステリルエーテルの検出を行う。検出は、用いた標識の種類に応じて適宜行うことができる。

例えば、ビオチンを標識として用いた場合には、ビオチンに特異的に結合するアビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出を行うことができる。例えば、コレステロールに結合したビオチン標識ポリエチレングリコールコレステリルエーテルに対して、アビジンまたはストレプトアビジンを反応させ、次いで、ビオチン化したアルカリホスファターゼを結合させると、ビオチンを介して酵素が結合する。未結合の酵素を除去した後、アルカリホスファターゼの基質であるニトロブルーテトラゾリウム (NBT) と 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) と反応させると、ビオチン標識ポリエチレングリコールコレステリルエーテルが存在する場合には紫色の発色が見られ、検出することができる。ジゴキシゲニンを標識として用いた場合には、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いて上記の方法と同様に検出を行うことができる。なお、発色用の酵素としては、アルカリホスファターゼ以外にも西洋ワサビペルオキシダーゼを用いる系も知られている。

フルオレセインなどの蛍光物質を使用した場合には、コレステロールとの反応後に蛍光を測定することによりコレステロールと結合したポリエチレングリコールコレステリルエーテルを検出することができる。蛍光は一定の励起光を照射して発生する蛍光エネルギーを測定することにより、蛍光の定性的または定量的な検出を行うことができる。定量に際しては、蛍光エネルギーの強度をコレステロールの存在量の指標として評価することもできる。蛍光エネルギーまたは蛍光は、市販の適当な検出器や蛍光顕微鏡などを用いて測定することができる。

放射性物質を使用した場合には、コレステロールとの反応後にコレステロールに結合した放射活性を当業者に公知の方法により測定することにより、コレステロールの検出を行うことができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1 : PEG-Chol を用いた in vitro での結合実験

(方法)

(1) 様々な量の各種脂質に対するビオチニル化 PEG-Chol (bPEG-Chol: ビオチン 1 分子が PEG(50)-Chol の末端エチレングリコール部分と結合している) ($10 \mu\text{M}$) の結合能を、既報の通り (K. Igarashi 他、J Biol Chem 270, 29075-8. (1995))、TLC プレート上でのオーバーレイ・アッセイにより分析した。結果を図 1 B に示す。

(2) 各種のリン脂質、糖脂質およびオレイン酸コレステロール (10nmol) に対する bPEG-Chol ($10 \mu\text{M}$) の結合を上記 (1) と同様に調べた。結果を図 1 C に示す。

(3) グルコシルセラミド (GlcCer) とスフィンゴミエリン (SM)、またはグルコシルセラミドとジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) との混合物 (図 1 D に示した比率で合計 30nmol) に対する bPEG-Chol の結合を分析した。結果を図 1 D に示す。

(4) GlcCer、SM、GlcCer+SM(1:1) および GlcCer+DOPC(1:1) の差動走査熱量測定 (DSC) のサーモグラムのトレースを測定した。MicroCal VP-DSC を使用して、 1mM リポソーム (GlcCer、SM、DOPC) または 2mM リポソーム (GlcCer+SM、GlcCer+DOPC) 懸濁液 $500 \mu\text{l}$ を計測した。結果を図 1 E に示す。

(5) GlcCer と DOPC との 1:1 混合物を含む単分子層の蛍光画像を取得した。脂質単分子層は、 0.5% C12-BODIPY-PC (分子プローブ) を含有する 1mM の GlcCer+DOPC のクロロホルム溶液 $20 \mu\text{l}$ を USI システム (Fukuoka, Japan) FSD-500 Langmuir-Blodgett のトラフに注入することにより作製した。C12-BODIPY-PC は、優先的に DOPC 層に分配された。表面圧力は 10mN/m に調整した。LM Plan FI 50x

対物レンズおよび東芝 3CCD カメラを備えた Olympus Power BX 蛍光顕微鏡を使用して蛍光画像を記録した。結果を図 1 F に示す。バーは $50\mu\text{m}$ を示す。

(6) 様々な量のコレステロールを含む 1mM のスフィンゴミエリン小胞を用いて、PEG 鎖の遠位末端にフルオレセインを含むフルオレセイン PEG-Chol (fPEG-Chol) (H. Ishiwata, 他、Biochim Biophys Acta 1359, 123-35 (1997)) の結合について分析した。小胞は、既報の通り (A. Miyazawa 他、Mol Immunol 25, 1025-31. (1988)) 作製した。小胞を fPEG-Chol と一緒に室温で 30 分間インキュベートした。未結合の fPEG-Chol を、 $15\text{K}\times\text{g}$ で 15 分間遠心分離して洗い流した。ペレットの蛍光を計測し、スフィンゴミエリンのリンによって標準化した。結果を図 1 G に示す。

(7) 膜間の fPEG-Chol の移動を分析した。 $500\mu\text{M}$ (最終濃度) の SM/Chol (1:1) リポソームを、 $0.5\mu\text{M}$ の fPEG-Chol および $0.5\mu\text{M}$ の N-ローダミン-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含有し、SM 単独または SM/Chol (1:1) から構成されるリポソーム ($50\mu\text{M}$) に添加した。 488nm で励起した蛍光の 535nm における発光スペクトルの時間的経過をモニターすることにより、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の放出を計測した。結果を図 1 H に示す。

なお、コレステロールおよびオレイン酸コレステロールは、Sigma (ミズーリ州セントルイス) から購入した。ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミドおよびラクトシルセラミドは Matreya (ペンシルベニア州ステートカレッジ) から購入した。他の全ての脂質は、Avanti Polar lipids (アラバマ州アラバスター) から購入した。

Chol はコレステロール、SM はスフィンゴミエリン、PC はホスファチジルコリン、PS はホスファチジルセリン、PE はホスファチジルエタノールアミン、PI はホスファチジルイノシトール、PA はホスファチジン酸、GM1 はガングリオシド GM1、GM2 はガングリオシド GM2、GM3 はガングリオシド GM3、GalCer はガラクトシルセラミド、GlcCer はグルコシルセラミド、LacCer はラクトシルセラミドである。

(結果)

ビオチニル化 PEG-Chol (bPEG-Chol: ビオチン 1 分子が PEG(50)-Chol の末端エチレングリコール部分と結合している) を様々な脂質のスポットに添加し、それを洗浄した後、基質として 4-クロロ-1-ナフトールを使用して HRP 結合ストレプトアビジンによりその結合を観察した (図 1 B 及び C) (A. Yamaji 他、J Biol Chem 273, 5300-6. (1998))。bPEG-Chol は、コレステロールおよび中性糖脂質 (例えばガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド (GlcCer) およびラクトシルセラミド) に結合した。しかし、bPEG-Chol は、試験したリン脂質及び酸性糖脂質 (ガングリオシド) には結合しなかった。bPEG-Chol は、コレステリルエステルおよびオレイン酸コレステロールにも結合しなかった。また、スフィンゴミエリン (SM) の添加により、bPEG-Chol とグルコシルセラミドと結合しなくなったが、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) にはそのような効果は生じなかった (図 1 D)。

差動走査熱量測定 (DSC) によれば、SM と GlcCer との等モル混合物のゲルから液体への結晶相転移温度は、SM と GlcCer についての当該温度の中間値であることが示された (図 1 E)。これに対して、DOPC と GlcCer との等モル混合物の前記相転移温度は GlcCer の相転移温度に非常に近く、そして DOPC の相転移温度は SM の該温度と比べてはるかに低い。これらの結果は、GlcCer は SM と混和することができるが、この脂質と DOPC との二成分混合物は異なるドメインに分離されることを示唆する。

GlcCer が DOPC から分離されることを実証するために、単分子層系を利用した (図 1 F)。単分子層の実験により、GlcCer (黒) は DOPC (緑) から分離して、空気と水との中間相にてドメインを形成することが判明した。この結果は、PEG-Chol と中性糖脂質とが互いに寄り集まっている場合にのみ、PEG-Chol は中性糖脂質と結合することを示唆する。細胞膜の界面活性剤溶解度 (D. A. Brown, 他、Cell 68, 533-44. (1992)) およびモデル膜における脂質配分の測定 (T. Y. Wang, 他、Biophys J 79, 1478-89. (2000)) から、糖脂質が細胞においてスフィンゴミエリンリッチな膜に分配されることが示唆される。生体膜においてスフィンゴミエリンが高濃度であることを考慮すると、この結果は、細胞では PEG-Chol は糖脂質には

ほとんど結合していないことを示唆する。糖脂質とは対照的に、スフィンゴミエリンの添加は、コレステロール含量が10%未満まで減少しない限り、コレステロールに対するbPEG-Cholの結合に影響を及ぼさなかった。

コレステロールに対するPEG-Cholの結合を調べるために、PEG鎖の遠位末端にフルオレセインを含むフルオレセイン PEG-Chol (fPEG-Chol) を使用して、リポソーム実験をさらに行った。オーバーレイ・アッセイと同様に、コレステロールの添加により、スフィンゴミエリン・リポソームに対するfPEG-Cholの結合が増加した(図1 G)。コレステロール含量が低い(10%)場合はfPEG-CholがSMリポソームと結合しなかったという事実は、上記膜において、fPEG-Cholがコレステロールリッチなドメインを認識することを示している。

PEG-Cholは水溶性であり膜間を移動することができる。図1 Hにおいて、膜間のfPEG-Cholの移動を測定した。fPEG-Cholの輸送を計測するために、fPEG-Cholと、非置換性マーカーであるローダミン標識したホスファチジルエタノールアミン(ローダミン-PE)との間の蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を測定した(J. W. Nichols, 他、Biochemistry 21, 1720-6. (1982))。供与リポソームにおいて、fPEG-Chol 蛍光は、FRETにより消光した。しかし、一旦、fPEG-Cholが受容リポソームに輸送されると、蛍光は消光しなくなった。SMリポソームを供与体として使用し、SM/Chol(1:1)リポソームを受容体として使用した場合、fPEG-Cholの効率的な輸送が観察された。一方、供与体および受容体の両方がSM/Chol(1:1)である場合、fPEG-Cholはほとんど移動しなかった。これらの結果は、PEG-Cholがコレステロールリッチな膜に優先的に組み込まれ、はその膜内に閉じ込められることを示している。

実施例2：細胞を用いたPEG-Cholによる標識実験

(方法)

既報の通り(T. Kobayashi 他、Nat Cell Biol 1, 113-8. (1999))、正常(図2 A～D)およびNPC(図2 E～H)のヒト皮膚繊維芽細胞を固定し、透過処理した。次

に、5 μ M の fPEG-Chol (図 2 A 及び E)、50 μ g/ml フィリピン (図 2 B 及び F) および抗 TGN 46 抗体 (Serotec Inc.、イギリス、オックスフォード) (図 2 C 及び G) を用いて細胞を三重標識した。Zeiss LSM 共焦点顕微鏡を使用して試料を観察した。図 2 D 及び H は合成画像を示す。白色は 3 種の蛍光団の共局在を示す。fPEG-Chol とフィリピンとで染色した試料については、蛍光が NPC 細胞において非常に明るいため、正常細胞と NPC 細胞には、レーザー光線を異なるように照射した。

図 2 I 及び J においては、NPC 細胞を通常血清 (図 2 I) および脱脂血清 (図 2 J) の存在下で増殖させた。細胞を透過化し、fPEG-Chol で標識した。

図 2 K 及び L においては、NPC 皮膚繊維芽細胞を固定して透過化した。次いで、1mM スフィンゴミエリン・リポソーム (図 2 K) またはスフィンゴミエリン/コレステロール (1:1) リポソーム (図 2 L) の存在下で、細胞を fPEG-Chol により標識した。

図 2 M ~ R においては、メラノーマ細胞株 MEB4 (図 2 M ~ O) および糖脂質合成に欠陥のある変異体 GM95 (図 2 P ~ R) を固定化し透過化した後、fPEG-Chol (図 2 M 及び P) およびフィリピン (図 2 N 及び Q) で二重標識した。MEB4 および GM95 における蛍光パターンの類似性は、fPEG-Chol による標識が主に糖脂質に依存するものではないことを示唆する。fPEG-Chol 標識はフィリピン標識と共局在した (図 2 O 及び R)。

(結果)

in vitro での PEG-Chol と様々な脂質との相互作用は、この分子が細胞において特定のコレステロールリッチな膜または膜ドメインに組み込まれることを示唆する。透過化処理したヒト皮膚繊維芽細胞に fPEG-Chol を添加すると、ゴルジ体が明るい蛍光を発光した (図 2 A)。同様の不明瞭な蛍光パターンは、コレステロールと複合体を形成するフィリピンを用いて以前にも観察されている (J. Sokol 他、J Biol Chem 263, 3411-7. (1988) ; 及び、T. Kobayashi 他、Nat Cell Biol

1, 113-8. (1999)). fPEG-Chol 染色は、トランスゴルジ網マーカーである TGN46 と部分的には共局在していた (A. R. Prescott, 他、Eur J Cell Biol 72, 238-46. (1997))。その重複が不完全であることは、ゴルジ体において TGN46 とコレステロールが異なった分布をしていることを示唆する。ニーマン-ピック病 C 型 (NPC) は、常染色体劣性の内臓神経疾患である。NPC 症候群の特徴は、非エステル化コレステロールが細胞内に蓄積することである (P. G. Pentchev 他、Biochim Biophys Acta 1225, 235-43. (1994); L. Liscum, Traffic 1, 218-25. (2000); 及び、T. Kobayashi 他、Nat Cell Biol 1, 113-8. (1999))。正常な繊維芽細胞とは異なり、NPC 繊維芽細胞においては、fPEG-Chol により核周囲の小胞ならびにゴルジ体が染色される (図 2 E)。この場合も、蛍光はフィリピン蛍光と共局在していた (図 2 F 及び H)。

リポタンパク質の不在下で NPC 細胞を増殖させると、コレステロールの蓄積が有意に減少した (J. Sokol 他、J Biol Chem 263, 3411-7. (1988))。NPC 細胞を、通常血清の代わりに脱脂血清の存在下で増殖させた場合、fPEG-Chol による核周囲の標識は著しく減少した (図 2 I 及び J)。fPEG-Chol を SM/Chol (1:1) リポソームと一緒に前培養すると、fPEG-Chol 標識は喪失した (図 2 L)。コレステロールを含まないスフィゴミエリンリポソームによる効果は、同条件下において著しく少ないことが示された (図 2 K)。fPEG-Chol は膜ドメインに組み込まれると、SM/Chol リポソームを用いても除去されないことから、fPEG-Chol は細胞中のコレステロールリッチな膜ドメインに閉じ込められていることが裏付けられる。

GM95 は、糖脂質合成に欠陥のあるメラノーマ細胞株である (S. Ichikawa, 他、Proc Natl Acad Sci USA 91, 2703-7. (1994))。PEG-Chol 染色における糖脂質の効果調べるために、GM95 と MEB4 親細胞とを比較した。GM95 および MEB4 の両細胞とも fPEG-Chol により同様に標識された (図 2 M 及び P)。また、その標識はフィリピン標識と共局在していた。これらの結果は、fPEG-Chol による細胞の標識は主に細胞のコレステロールに依存するが、糖脂質には依存しないことを示す。

実施例 3 : fPEG-Chol の細胞表面の分布

(方法)

正常なヒトの皮膚繊維芽細胞を、 $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol および $5\mu\text{M}$ AlexaFluor 594 標識したコレラトキシンとともに室温で 90 秒間インキュベートし、次いでパラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。図 3 の A 及び C は fPEG-Chol 蛍光、図 3 の B 及び D は AlexaFluor 594 蛍光である。小さい矢印は、fPEG-Chol とコレラトキシンの二重に標識された構造を示す。大きな矢印は、fPEG-Chol のみで標識された構造を示す。矢じりは、コレラトキシンのみによって陽性を示すスポットを示す。図 3 の E 及び F においては、固定前に、 10mM の $\text{M}\beta\text{CD}$ による 37°C で 30 分間の処理を細胞に施すか (E)、または施さなかった (F)。次いで、細胞を $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol で標識した。図 3 においてバーは $4\mu\text{m}$ を示す。

図 4 の G～L においては、正常な皮膚繊維芽細胞を $2\mu\text{M}$ の fPEG-Chol で標識し、さらに $5\mu\text{g/ml}$ ビオチニル化上皮増殖因子 (EGF) とともに 4°C で 20 分間 (図 4 の G 及び H)、または 37°C で 2 分間 (図 4 の I 及び L) インキュベートした。次に細胞を 3%PFA、8%スクロースを含む PBS により固定し、急冷して TRITC 標識したストレプトアビジンとともに 4°C で 20 分間インキュベートした。Hamamatsu C-4742-98 冷却 CCD カメラを備えた Nikon TE 300 顕微鏡で試料を観察した。図 4 の G 及び I は fPEG-Chol 蛍光、図 4 の H 及び J は AlexaFluor 594 の EGF 蛍光である。図 4 の K および L においては、細胞を、 $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol および AlexaFluor 594 標識したコレラトキシン B サブユニットで二重に標識した後、未標識 EGF で刺激した。図 4 の K は fPEG-Chol 蛍光、図 4 の L はコレラトキシン蛍光である。図 4 においてバーは $4\mu\text{m}$ を示す。

図 5 の M～P においては、B 細胞株 A20.2J を抗体なしで 37°C で 1 分間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、1%PFA で 30 分間固定し、さらに氷上において 45 分間、 $0.7\mu\text{M}$ の fPEG-Chol および $10\mu\text{g/ml}$ の Alexa 546 結合コレラトキシン B サブユニットを含有する 0.1%BSA を用いて標識した。洗浄後、Zeiss LSM 510 共焦点顕微鏡の下で、染色された細胞を観察した。図 5 の M は fPEG-Chol 標識、図 5 の N はコレラトキシン標識、図 5 の O は合成画像、図 5 の P は位相差画像で

ある。これらの条件下において、fPEG-Chol は固定した細胞に浸透することが可能となり、細胞内膜ならびに原形質膜を染色する。対照的に、コレラトキシンは細胞内に入らず、細胞表面のみを染色した。

図 5 の Q～T では、A20.2J 細胞をマウス IgG+IgM に特異的な F(ab')₂ ヤギ抗体 (F(ab')₂ 抗 Ig) 15 μ g/ml を用いて 37°C で 1 分間刺激した。次いで上記と同様に細胞を固定し、染色した。図 5 の Q は fPEG-Chol 標識、図 5 の R はコレラトキシン標識、図 5 の S は合成画像、図 5 の T は位相差画像である。

(結果)

実施例 3 では、fPEG-Chol の細胞表面の分布を調べた (図 3～図 5)。

正常なヒトの皮膚繊維芽細胞を fPEG-Chol で処理し、洗浄及び固定した。小さいドメイン (直径 200～500nm) において、より強い蛍光で標識されている不均一な表面が認められた (図 3 A 及び C)。これらのドメインの一部は、Alexa Fluor 594 標識したコレラトキシン B 鎖と共局在していた (図 3 B 及び D)。コレラトキシンは、原形質膜に非ランダムに分布しカベオラに蓄積する GM1 と結合する (R. G. Parton, J Histochem Cytochem 42, 155-66. (1994))。細胞を、コレステロールを細胞から特異的に除去するメチル- β -シクロデキストリン (M β CD) で前処理すると、fPEG-Chol 染色が失われた (図 3 E 及び F) (G. H. Rothblat 他、J Lipid Res 40, 781-96. (1999))。

次に、細胞を上皮増殖因子 (EGF) で刺激しなかった場合の fPEG-Chol の分布を測定した。EGF 受容体はコレステロールリッチな原形質膜ドメインを特定しており、EGF 受容体への EGF の結合は細胞表面のコレステロールに依存することが示唆された (M. G. Waugh, 他、Biochem Soc Trans 29, 509-11. (2001) ; K. Roepstorff, 他、J Biol Chem 277, 8 (2002) ; 及び、T. Ringerike, 他、J Cell Sci 115, 1331-40. (2002))。fPEG-Chol 蛍光は、EGF を 4°C で添加した場合のビオチン標識 EGF の分布と共局在していた (図 4 G 及び H)。EGF を 37°C で添加すると、EGF 受容体のクラスター化が観察された (図 4 J)。これらのクラスターは fPEG-Chol で標識された (図 4 I)。GM1 の細胞表面の分布もこの条件下で調べた。GM1 もこれらのクラスター

において富化されており、さらに fPEG-Chol と共局在していた (図 4 K 及び L)。これらの結果は、EGF が、コレステロールおよび GM1 の両方について EGF 受容体が富化されている前記クラスターへの分配を誘導することを示す。

原形質膜ガングリオシドは、B 細胞株 A20. 2J の原形質膜上の B 細胞抗原受容体が架橋される際に再分配される (M. J. Aman, 他、J Biol Chem 276; 46371-8. (2001))。F(ab')₂ 抗 Ig での処理により fPEG-Chol が再分配されるかどうかを調べた。処理前では、Alexa Fluor 594 標識したコレラトキシンおよび fPEG-Chol により表面全体の輪郭が浮かび上がった (図 5 の M~P)。しかし、F(ab')₂ 断片で 1 分間刺激した後には、コレラトキシンは凝集構造となって原形質膜に蓄積した (図 5 の R)。fPEG-Chol もこの構造に局在した (図 5 の Q 及び S)。この結果は、B 細胞株の刺激の際にコレステロールが GM1 と一緒に再分配されることを示す。

実施例 4：コレステロールの膜内分布及び細胞表面での挙動の分析

(方法)

(1) 上記の通り、ストレプトリジン 0 を使用して正常 (図 6 の A) および NPC (図 6 の B) 繊維芽細胞の原形質膜を透過化した。細胞を、fPEG-Chol とともに室温で 30 分間インキュベートした後に洗浄し、Zeiss LSM 510 共焦点顕微鏡の下で蛍光画像を撮影した。結果を図 6 に示す。

(2) 正常繊維芽細胞 (図 7 の C~H) および NPC 繊維芽細胞 (図 7 の I~N) を、1 μ M の fPEG-Chol とともに室温で 5 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、1mg/ml ローダミン・デキストランの存在下において、37°C で 10 分間 (図 7 の F、I、L)、60 分間 (図 7 の D、G、J、M) および 180 分間 (図 7 の E、H、K、N) インキュベートした。結果を図 7 に示す。

(3) NPC 繊維芽細胞を、1 μ M の fPEG-Chol とともに室温で 5 分間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、37°C で 30 分間インキュベートした (図 8 O)。NPC 繊維芽細胞を、1 μ M の fPEG-Chol とともに 4°C で 30 分間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、撮影した。次に細胞を洗浄し、37°C で 30 分間インキュベートし

た(図 8 P)。NPC 繊維芽細胞を、 $5\mu\text{g/ml}$ のプレフェルジン A で 30 分間(図 8 Q)、 $5\mu\text{g/ml}$ のノコダゾールで 90 分間(図 8 R)、または $5\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B で 30 分間(図 8 S)処理した後、 $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol および 1mg/ml のローダミン・デキストランとともに 30 分間インキュベートした。図 8 Tにおいては、NPC 繊維芽細胞を $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol とともに 30 分間インキュベートした後、 $5\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B で 30 分間処理した。図 6～8 において、バーは $20\mu\text{m}$ を示す。

(結果)

コレステロールの膜内分布については従来ほとんど報告がない。本実施例では半透過性細胞を使用して、コレステロールが細胞内膜の細胞原形質側に局在するのか内腔側に局在するのかを調べた。正常および NPC 皮膚繊維芽細胞の原形質膜を細菌毒素ストレプトリジン 0 により、選択的に透過化した。次に細胞を fPEG-Chol とともにインキュベートした(図 6 A 及び B)。fPEG-Chol 染色は、固定し透過化した細胞で得られた染色とは著しく異なっていた(図 2 A 及び E)。さらに、正常細胞と NPC 細胞には大きな違いがあった。正常な皮膚繊維芽細胞では、周辺部の小胞様構造が強く染色されたが、NPC 細胞では、網状様の構造が可視化された。この構造は、細胞を固定して透過化した後では見られなかったことから、この区画は壊れやすいか、あるいは界面活性剤により傷害を受けやすいことが示唆される。ゴルジ体および後期エンドソーム/リソソームは、これらの条件下では、ほとんど標識されなかった。これらの結果から、コレステロールがこれらのオルガネラの内腔にのみ存在することが示唆される。一方、正常な繊維芽細胞の周辺部の小胞および NPC 細胞の網状構造は、細胞質膜にコレステロールを含む。

NPC 細胞における遊離コレステロールの細胞内蓄積の詳細なメカニズムは未解明である。最近の研究によれば、膜区画間のコレステロールの活発な流れのアンバランスが蓄積を引き起こすことを示している(Y. Lange, 他、J Biol Chem 275, 17468-75. (2000))。生体内で合成されたコレステロールおよび LDL を介して得られるコレステロールはともに原形質膜に到達後、続いて細胞内に取り込まれる。

Cruz ら (J. C. Cruz, 他、J Biol Chem 275, 4013-21. (2000)) は、NPC1 (即ち、それに突然変異が生じることにより前記疾患の原因となる遺伝子によりコードされるタンパク質) が、原形質膜以後のコレステロール転送経路に関与することを示唆した。フィリピンは毒性があるため、細胞表面のコレステロールの挙動の追跡のためには適当でない。蛍光コレステロール類似体であるデヒドロエルゴステロールは、CHO 細胞株において、エンドサイトーシスを受けて再生区画に蓄積されることが示された (S. Mukherjee, 他、Biophys J 75, 1915-25. (1998) ; 及び、M. Hao 他、J Biol Chem 277, 609-17. (2002))。DHE は、3 つ多い二重結合と追加のメチル基をもつ点で、コレステロールとは異なる。近年、ペルフルリンゴリシン 0 がコレステロールリッチな膜ドメインに選択的に結合することが判明した (A. A. Waheed 他、Proc Natl Acad Sci USA 98, 4926-31. (2001) ; 及び、W. Mobius 他、J Histochem Cytochem 50, 43-55. (2002))。fPEG-Chol の利点としては、蛍光団の安定性および量子効率が高いこと、バックグラウンド染色が低いこと、細胞毒性が低いこと、並びにサイズが比較的小さいために実施濃度での構造摂動が少ないことなどが挙げられる。

正常な繊維芽細胞と NPC 繊維芽細胞とを用いて、細胞表面の fPEG-Chol の挙動を比較した (図 7 の C ~ N)。本実験では $1\mu\text{M}$ の fPEG-Chol を使用した。この濃度の fPEG-Chol は、この系においてはデキストランおよびコレラトキシンのエンドサイトーシスに影響を及ぼさない。細胞を fPEG-Chol とともに室温で 5 分間インキュベートし、洗浄し、さらに 1mg/ml ローダミン・デキストランの存在下、 37°C でインキュベートした。正常な繊維芽細胞では、fPEG-Chol で 5 分間標識した後、細胞表面が強く標識された。10 分間の追跡後、蛍光の大部分は原形質膜上に残っていた (図 7 の C 及び F)。60 分間の追跡後、核は細胞質の蛍光発光した区画に囲まれた非標識オルガネラとして認識された (図 7 の D)。これらの区画の全体パターンは、CHO 細胞において DHE- $\text{M}\beta\text{CD}$ により検出したものと同様であった (M. Hao 他、J Biol Chem 277, 609-17. (2002))。しかし、fPEG-Chol は細胞内の小胞も染色した。これらの小胞の大部分は、細胞内に取り込みされたローダミン・

デキストランとは共局在しなかった（図 7 の G）。これらの小胞は、図 6 A での観察と同様に、細胞の周辺部で観察される場合が多い。180 分後、ゴルジ体は fPEG-Chol で顕著に標識され、ローダミン蛍光発光はエンドソーム／リソソーム中に分布していた（図 7 の E 及び H）。NPC 繊維芽細胞における fPEG-Chol の挙動は著しく異なっていた。10 分の追跡後、fPEG-Chol は特徴的な網状構造を染色したが（図 7 の I 及び L）、これは正常細胞では全く観察されなかった。180 分の追跡後でも、大部分の fPEG-Chol はこの構造中に残存し、ゴルジ蛍光発光はほとんど見られなかった（図 7 の J 及び M）。細胞内に取り込みされたローダミン・デキストランが網状構造に囲まれる場合もあり（図 7 M、矢印）、これらの構造がエンドサイトーシス性区画の特徴をもつことが示唆される。これらの構造は、図 6 B において観察されるものと非常に類似している。

網状構造への fPEG-Chol の組み込みは、温度に依存する。4°C では、fPEG-Chol は原形質膜上にとどまり、網状体に組み込まれなかった（図 8 P）。図 8 P はまた、fPEG-Chol が自然発生的には二分子層横断移動を起こさないことを示す。自然発生的にフリップフロップを起こす蛍光団は、これらの条件下において細胞内膜を染色する（R. E. Pagano, 他、J Cell Biol 91, 872-7. (1981)；及び、R. E. Pagano, 他、J Biol Chem 260, 1909-16. (1985)）。次に、阻害剤の存在下における fPEG-Chol およびローダミン・デキストランのインターナリゼーションを計測した。Brefeldin A（ゴルジ後輸送およびノコダゾールの阻害剤。微小管集合を阻害する）は、fPEG-Chol の網状体への組み込みにほぼ影響を及ぼさなかった。対照的に、網状構造はサイトカラシン B（これはアクチン重合を阻害する）により消失した。サイトカラシン B は、ローダミン・デキストランのインターナリゼーションに影響を及ぼさなかった。図 8 T においては、サイトカラシン B による処理の前に、fPEG-Chol により細胞を標識した。この場合もやはり、網状構造は消失し、このことから網状構造がアクチン網に依存することが示唆される。

産業上の利用の可能性

上記した実施例の結果から、fPEG-Chol はコレステロールリッチなドメインを可視化するための有利な手段であることが実証された。即ち、本発明によれば、蛍光団の安定性および量子効率が高く、バックグラウンド染色が低く、細胞毒性が低く、さらにサイズが比較的小さいために実施濃度での構造擾動が少ないといった利点を有する新規なコレステロール検出試薬が提供されることになった。

請求の範囲

1. 標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを含む、コレステロール検出試薬。
2. ポリエチレングリコールコレステリルエーテルが親和性物質又は蛍光物質で標識されている、請求項1に記載のコレステロール検出試薬。
3. 標識されていてもよいポリエチレングリコールコレステリルエーテルを用いることを特徴とする、コレステロールの検出方法。
4. 親和性物質又は蛍光物質で標識されているポリエチレングリコールコレステリルエーテルを用いる、請求項3に記載のコレステロールの検出方法。

図 1.

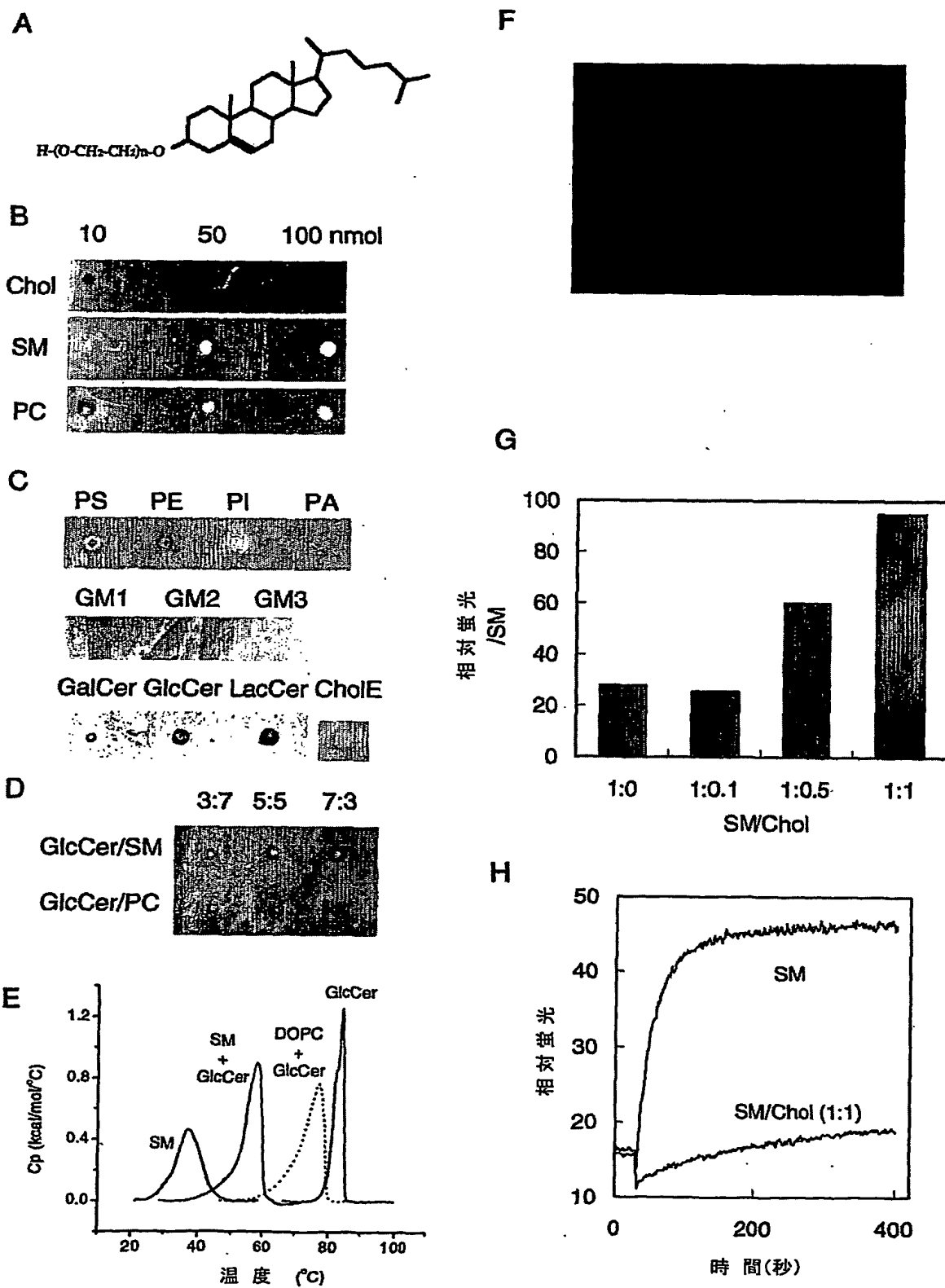


図 2

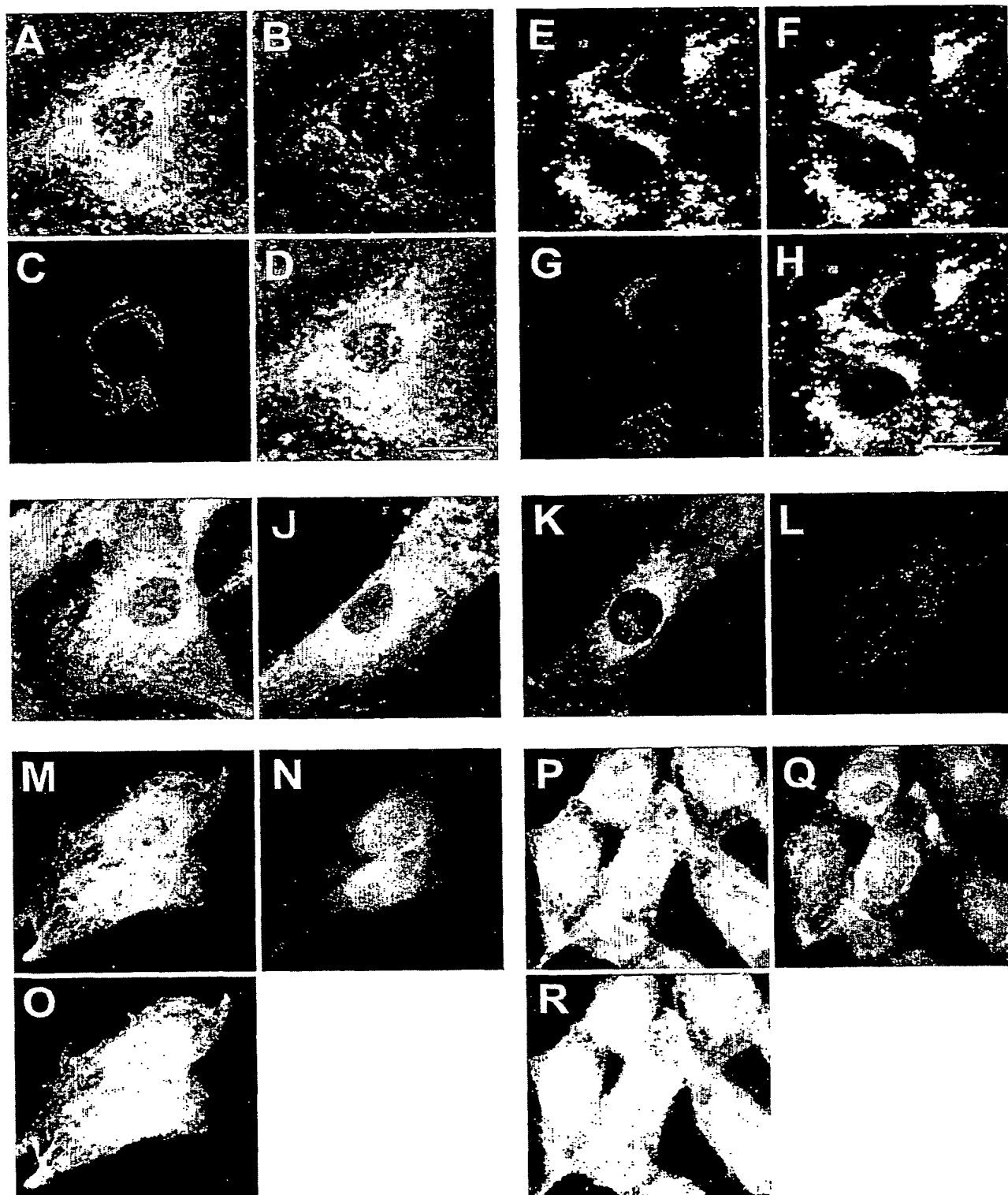


図 3

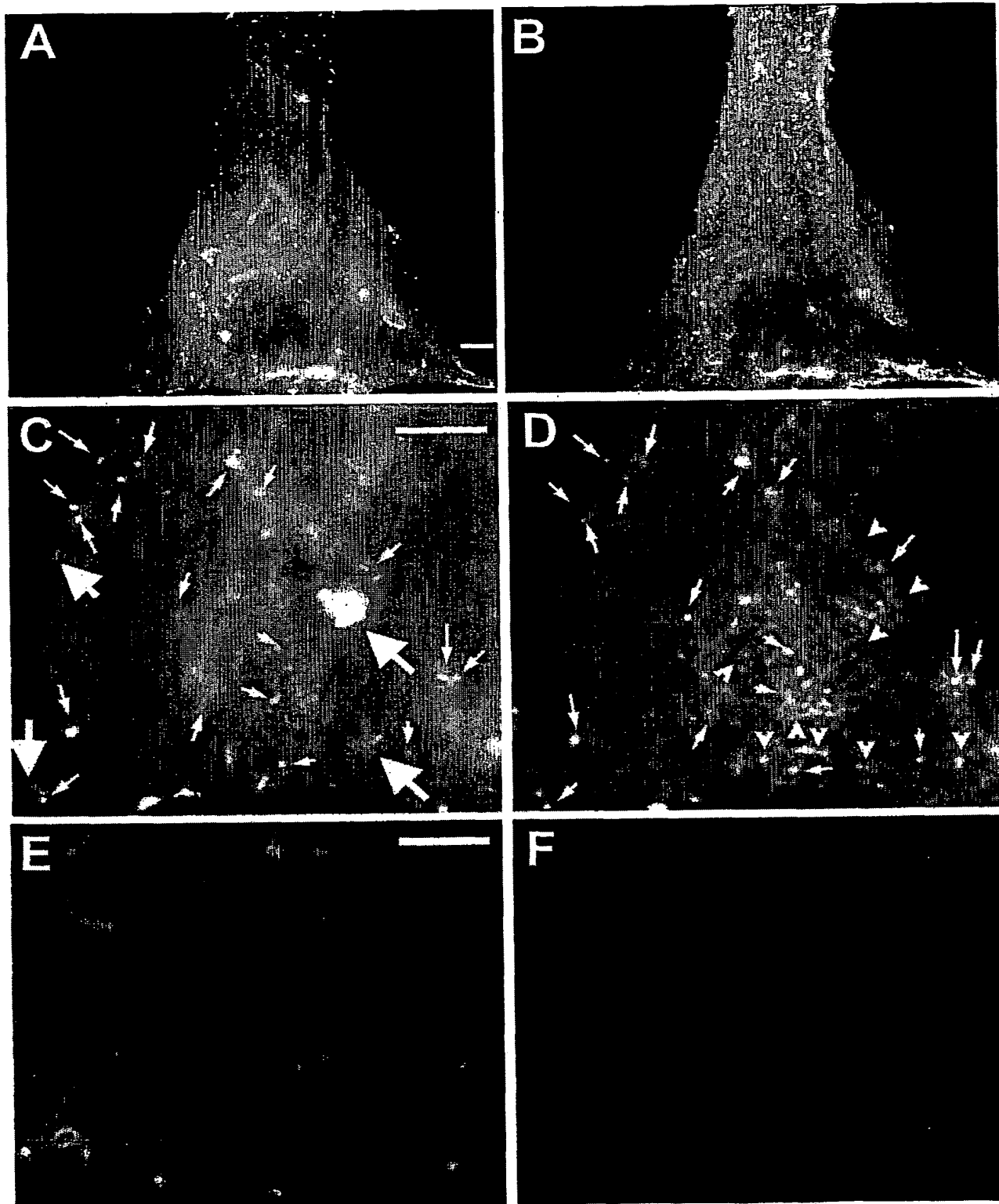


図 4

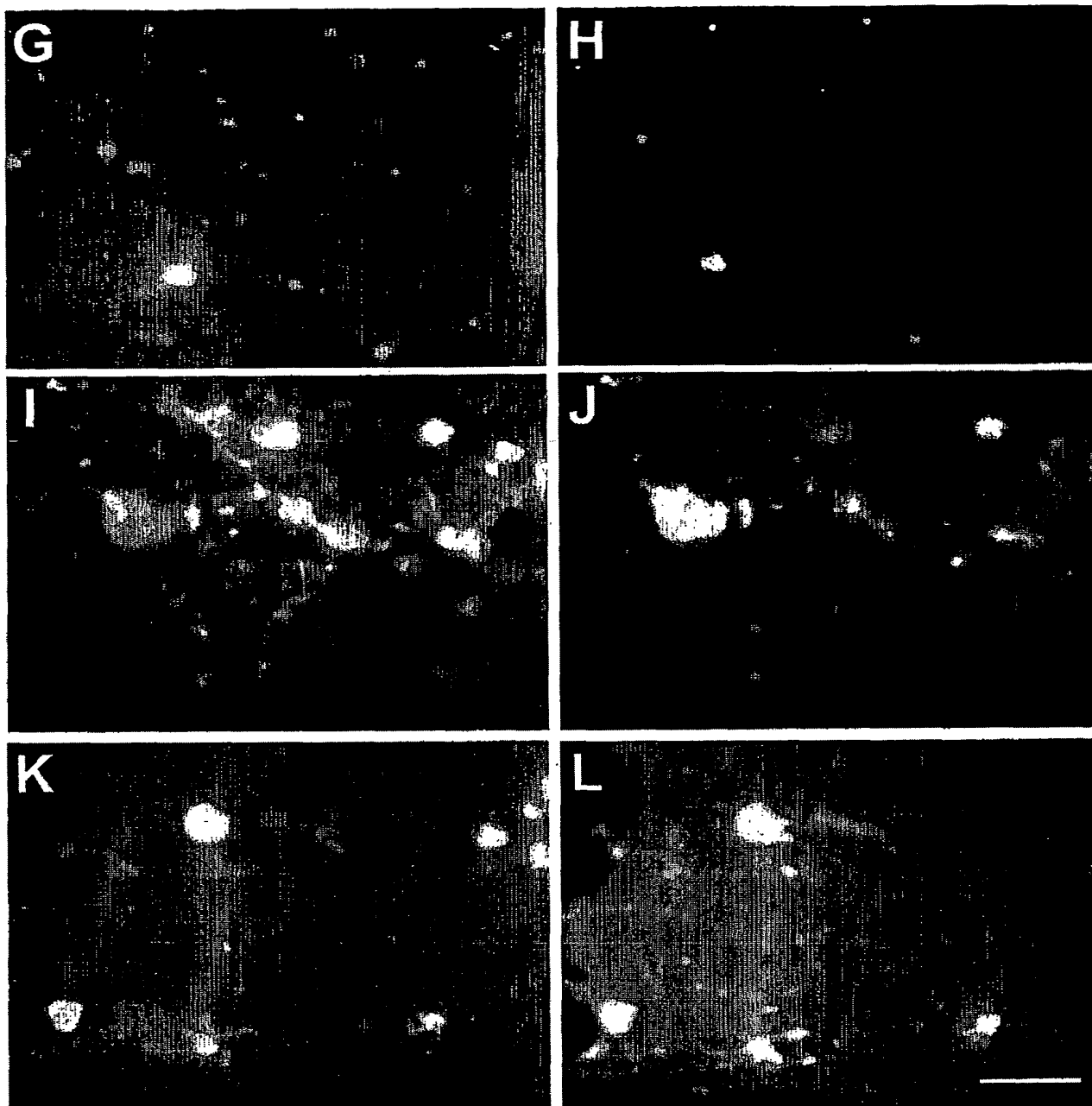


図 5

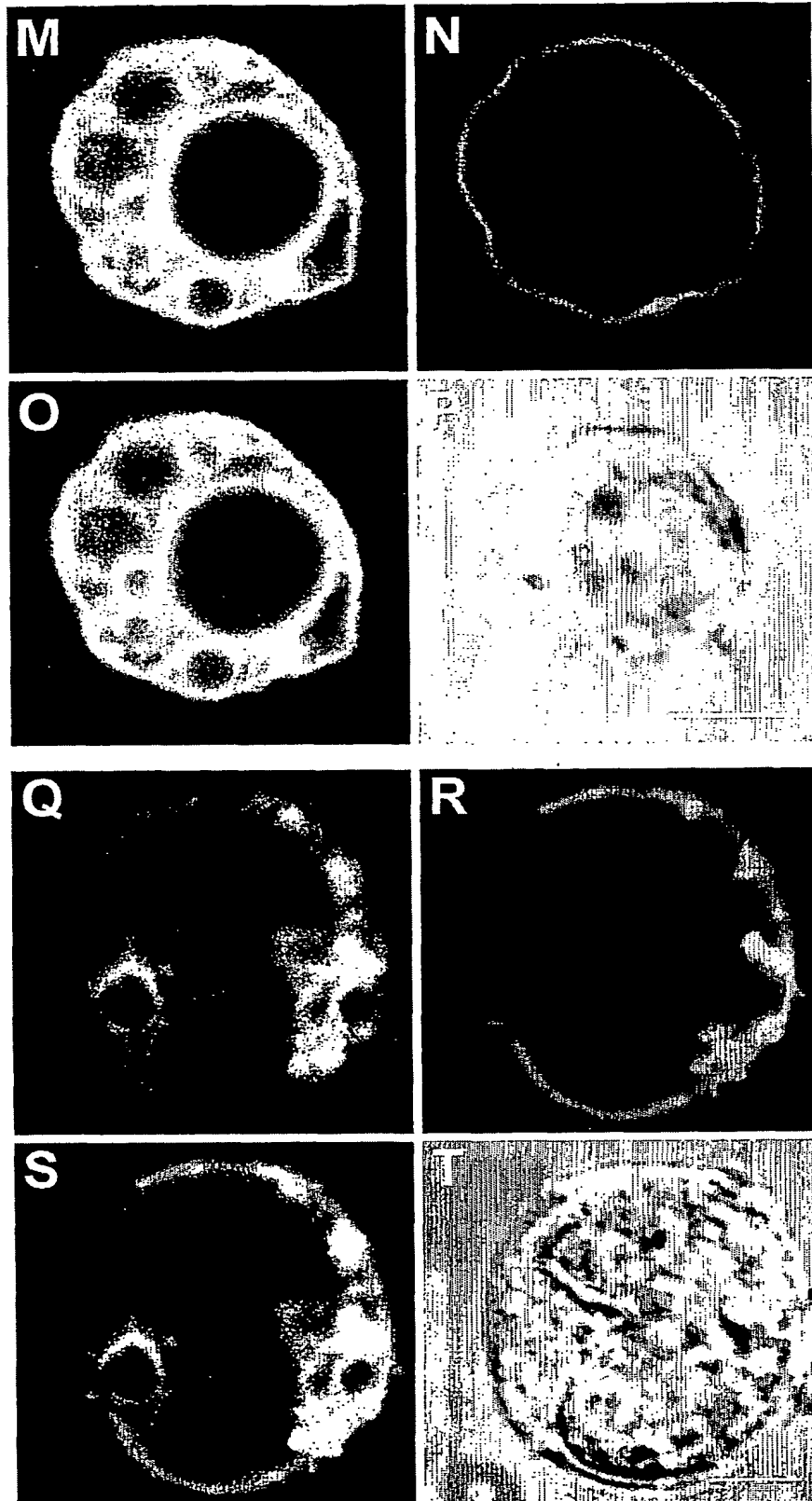
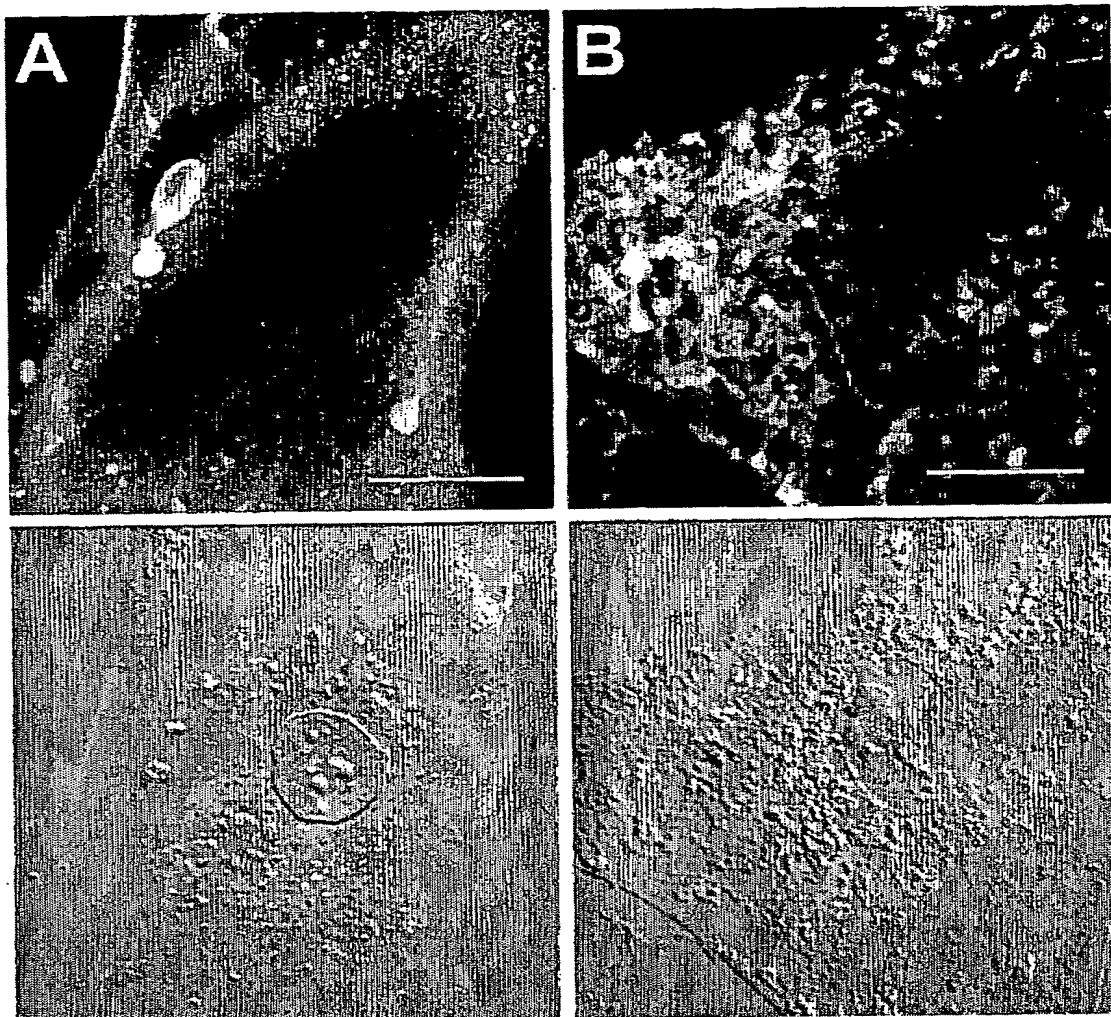


図 6



☒ 7

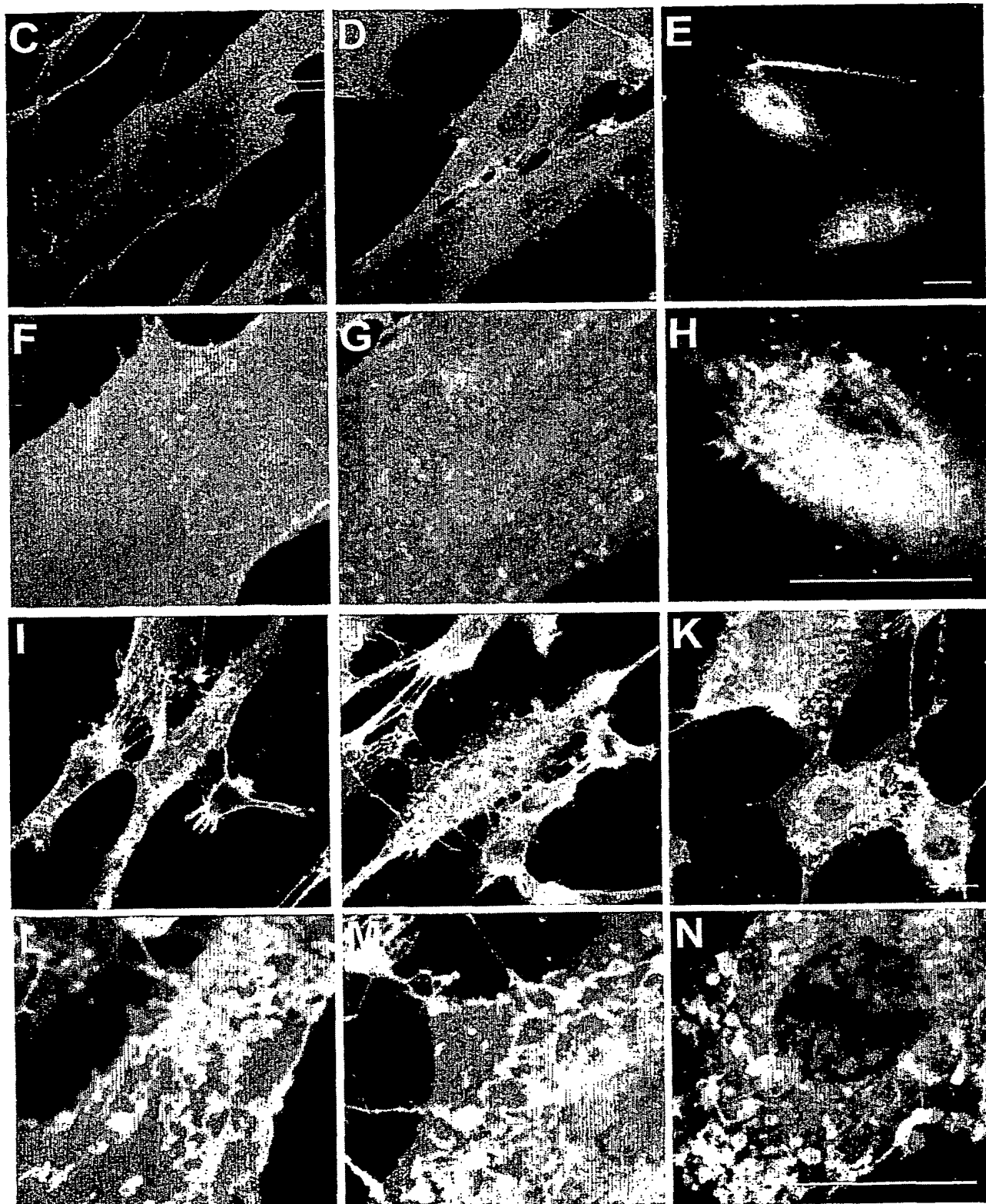
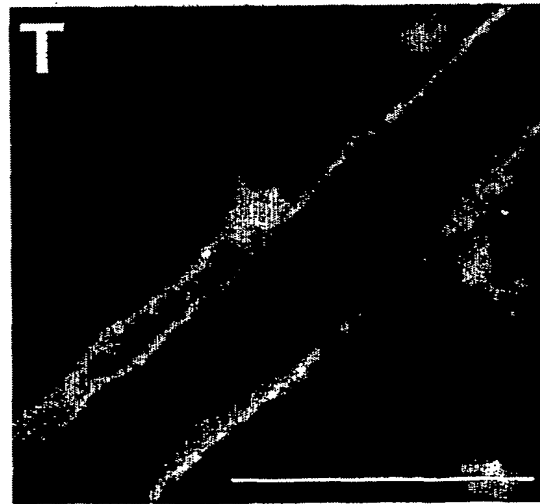
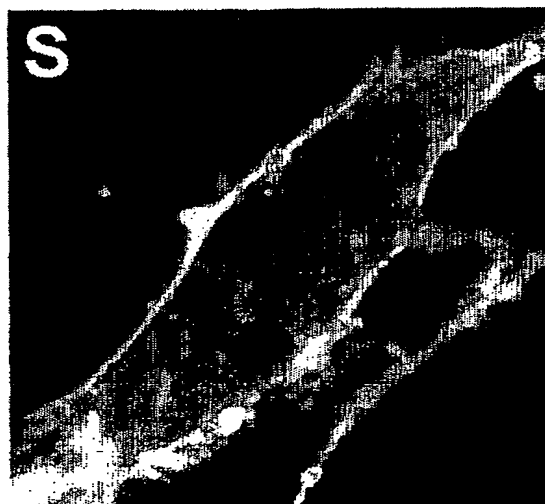
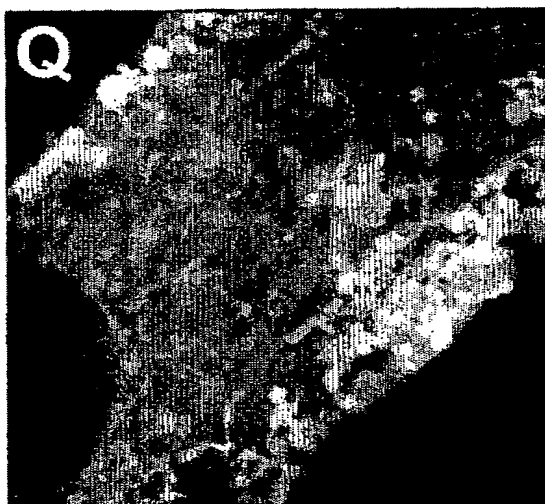


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/48-33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA, REG.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L.F. AMOROSA et al., "The effects of polyoxyethylated cholesterol feeding on hepatic cholesterol synthesis and intestinal cholesterol absorption in rats", Atherosclerosis, Vol.64, (1987), pages 117 to 123	1-4
A	Hideki ISHIWATA et al., "Physical-Chemistry Characteristics and Biodistribution of Poly (ethylene glycol)-Coated Liposomes Using Poly (oxyethylene) Cholesteryl Ether", Chem.Pharm. Bull., Vol.43, No.6, (1995), pages 1005 to 1011	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 July, 2003 (08.07.03)

Date of mailing of the international search report
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06841

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-131197 A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 28 May, 1996 (28.05.96), & EP 699767 A & WO 95/24502 A & US 5691159 A & KR 188576 A & HK 1000716 A & CA 2162289 A & CN 1126495 A & DE 699767 A & ES 2106694 A	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/92

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/48-33/98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA、REG

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	L.F.AMOROSA et al, "The effects of polyoxyethylated cholesterol feeding on hepatic cholesterol synthesis and intestinal cholesterol absorption in rats" Atherosclerosis, Vol.64 (1987) p117-123	1-4
A	Hideki ISHIWATA et al, "Physical-Chemistry Characteristics and Biodistribution of Poly(ethylene glycol)-Coated Liposomes Using Poly(oxyethylene) Cholesteryl Ether" Chem. Pharm. Bull., Vol.43, No.6(1995) p1005-1011	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-131197 A(協和メデックス株式会社) 1996. 05. 28 & EP 699767 A & WO 95/24502 A & US 5691159 A & KR 188576 A & HK 1000716 A & CA 2162289 A & CN 1126495 A & DE 699767 A & ES 2106694 A	1-4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.